

WO0216431

Publication Title:

PEPTIDES OF THE DOLLAR G(A)1-ADRENERGIC RECEPTOR AND THEIR USE FOR PSORIASIS

Abstract:

Abstract of WO 0216431

(A2) The invention relates to peptides of the alpha 1-adrenergic receptor, to their use and to their secondary products in antigenic and immunogenic agents or test kits, especially for eliminating specifically binding, cytophysiologically active, pathological antibodies in cases of psoriasis and for diagnosing the presence of said antibodies. The invention also relates to a method for identifying anti- alpha -adrenergic receptor antibodies in biological liquids.

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

**(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG**

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
28. Februar 2002 (28.02.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/16431 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C07K 14/705**, 7/08, 16/28, A61K 38/17, G01N 33/566

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE01/03140

(22) Internationales Anmeldedatum:
23. August 2001 (23.08.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 41 560.1 24. August 2000 (24.08.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **MAX-DELBRÜCK-CENTRUM FÜR MOLEKULARE MEDIZIN** [DE/DE]; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **WALLUKAT, Gerd** [DE/DE]; Wolkensteinstrasse 4, 13129 Berlin (DE).

(74) Anwalt: **BAUMBACH, Fritz**; Robert-Rössle-Strasse 10, 13125 Berlin (DE).

(81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zwei-Buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.



WO 02/16431 A2

(54) Title: PEPTIDES OF THE $\$G(A)1$ -ADRENERGIC RECEPTOR AND THEIR USE FOR PSORIASIS

(54) Bezeichnung: PEPTIDE DES $\alpha 1$ -ADRENERGEN REZEPTORS UND IHRE VERWENDUNG BEI PSORIASIS

(57) Abstract: The invention relates to peptides of the $\alpha 1$ -adrenergic receptor, to their use and to their secondary products in antigenic and immunogenic agents or test kits, especially for eliminating specifically binding, cytophysiologically active, pathological antibodies in cases of psoriasis and for diagnosing the presence of said antibodies. The invention also relates to a method for identifying anti- α -adrenergic receptor antibodies in biological liquids.

(57) Zusammenfassung: Die Erfindung betrifft Peptide des $\alpha 1$ -adrenergen Rezeptors und ihre Verwendung sowie deren Folgeprodukte in antigenen und immunogenen Mitteln bzw. Testkits, insbesondere zur Elimination von spezifisch bindenden, zellphysiologisch aktiven, pathologischen Antikörpern bei Psoriasis sowie für ihren diagnostischen Nachweis. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Anti- $\alpha 1$ -adrenergen Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten.

Peptide des α 1-adrenergen Rezeptors und ihre Verwendung bei Psoriasis

Die Erfindung betrifft Peptide des α 1-adrenergen Rezeptors und ihre Verwendung sowie deren Folgeprodukte in antigenen und immunogenen Mitteln bzw. Testkits, insbesondere zur Elimination von spezifisch bindenden, zellphysiologisch aktiven, pathologischen Antikörpern bei Psoriasis sowie für ihren diagnostischen Nachweis. Außerdem betrifft die Erfindung ein Verfahren zum Nachweis von Anti- α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten.

Psoriasis ist eine gehäuft vorkommende Hautkrankheit, bei der es vor allem unter bestimmten auslösenden Bedingungen (z.B. Klima, mechanische Irritation, bei Stoffwechselstörungen u.a.) infolge gesteigerter Proliferation der Epidermis zu starker Schuppenbildung kommt. Sie verläuft in Schüben oder chronisch und tritt bei 2% der Bevölkerung auf. Neben einer genetischen Prädisposition werden eine infektiöse bzw. eine autoimmunologische Ursache diskutiert. Dabei wird bisher angenommen, dass die Ursache der Psoriasis auf eine gestörte Immunantwort zurückzuführen ist. Weiterhin spielt die humorale Komponente des Immunsystems bei dieser Erkrankung ebenfalls eine entscheidende Rolle. Die Psoriasis kann in jedem Lebensalter auftreten und ist bisher nicht heilbar. Oft ist ein lebenslanger Verlauf zu beobachten. Die häufigste Form ist die Psoriasis vulgaris. Bei dieser Form finden sich ohne Störungen des Allgemeinbefindens entzündliche gerötete mit Schuppen bedeckte Herde an der Haut.

Die Aufgabe der Erfindung bestand darin, Substanzen zu finden, die bei Psoriasis den Nachweis von pathologischen Antikörpern und/oder die Behandlung von Psoriasis ermöglichen, und diese in entsprechenden Arzneimitteln und Testkits bereitzustellen. Eine weitere Aufgabe besteht darin, die Elimination solcher Antikörper aus dem Blut zu ermöglichen.

Die Erfindung beruht auf dem erstmaligen Nachweis, daß Patienten mit Psoriasis spezifische Antikörper gegen α 1-adrenergen Rezeptoren aufweisen. Die beobachteten α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörper führen zu einer Aktivierung des α 1-adrenergen Rezeptors, die wahrscheinlich mit einer peripheren Vasokonstriktion und einer Mastzellgranulation einhergeht.

Serumproben von Patienten mit Psoriasis enthalten Autoantikörper, die gegen den α 1-adrenergen Rezeptorsubtyp gerichtet sind. In einem Bioassay entfalten diese Antikörper einen positiv chronotropen Effekt. Dieser Effekt wird selektiv durch den α 1-adrenergen Antagonisten Prazosin geblockt und durch die beschriebenen Peptidsequenzen neutralisiert.

Es wurde überraschend festgestellt, daß die Antikörper ein Epitop des α 1-adrenergen Rezeptors erkennen und daß sie mit Hilfe von Peptiden, die diesem Epitop entsprechen, neutralisiert bzw. affinitätschromatographisch gereinigt werden können. Das Epitop ist durch die Aminosäuresequenzen LEVLGYWVLGRIFCD, GRIFCD des α 1B I-adrenergen Rezeptors, durch die Sequenzen FWAFGRAFCDV, GRAFCDV des α 1A I-adrenergen Rezeptors sowie durch die Sequenzen YWAFGRVFCNI, GRVFCNI des α 1D-adrenergen Rezeptors, sowie durch die Sequenz GRTFCDV charakterisiert.

Bei Patienten mit Psoriasis läßt sich aus dem Plasma eine Immunglobulinfraktion isolieren, welche Autoantikörper enthält, die an den α 1-adrenergen Rezeptor binden und darüber die Zelle aktivieren.

Fügt man – in vitro – den Immunglobulinfraktionen der Psoriasis-Patienten Peptide des α 1-adrenergen Rezeptors zu, welche die Bindungsstelle für die Antikörper darstellen, läßt sich der pathologische Effekt der Autoantikörper aufheben. Das ist auch durch die erfindungsgemäßen funktionsanalogen Peptide möglich.

Überraschend ist, dass dieselben Epitopstrukturen, wenn sie an eine Festphase gebunden sind, aus dem Blutplasma von den Patienten die Antikörper eliminieren, die für die pathologischen Effekte zuständig sind.

Gegenstand der Erfindung sind somit Peptide sowie ihre Mutanten und Varianten, die pathologische Autoantikörper aus dem Plasma von Patienten mit Psoriasis erkennen, binden und eliminieren. Es sind Peptide, die das die physiologisch aktiven Autoantikörper bindende Epitop des α 1-adrenergen Rezeptors enthalten sowie funktionsanaloge Varianten, die ein Epitop bilden und Autoantikörper binden können, die bei Psoriasis vorkommen.

Bevorzugt sind es Peptide, die ganz oder teilweise oder als Variante der Sequenzen

Nr. 1 - LEVLGYWVLGRIFCD,

Nr. 2 - GRIFCD,

Nr. 3 - FWAFGRAFCDV,

Nr. 4 - GRAFCDV,

Nr. 5 - YWAFGRVFCNI,

Nr. 6 - GRVFCNI,

Nr. 7 - GRTFCDV

aufgebaut sind.

Die Peptide werden nach an sich bekannten Verfahren durch Aufbau der Aminosäuren synthetisiert oder gentechnisch hergestellt.

Erfindungsgemäße Antikörper, die gegen das Epitop des α 1-adrenergen Rezeptors gerichtet sind, sind dadurch gekennzeichnet, daß sie diese Peptide erkennen. Bevorzugt erkennen sie die Peptide der Sequenzen Nr. 1 bis Nr. 7 bzw. seine Mutanten und Varianten. Sie werden nach an sich bekannten Verfahren durch Immunisierung von Kleinsäugern oder Immunisierung von Milzzellen in vitro mit den erfundungsgemäßen Peptiden hergestellt.

Anwendung finden die Antikörper in verschiedenen Bio-Assays, immunologischen Nachweissystemen und ELISA-Testsystemen.

Weiterhin betrifft die Erfindung antigenen Mittel zum Nachweis von Psoriasis, die mindestens ein erfundungsgemäßes Peptid, vorzugsweise ein oder mehrere Peptide der Nr. 1 bis 7 enthalten. Sie reagieren mit den bei Psoriasis vorkommenden spezifischen Antikörpern gegen α 1-adrenergen Rezeptoren.

Ggf. sind die antigenen Mittel an verschiedene Träger gebunden, wie z.B. aktivierte Sepharosen, Zellulosen oder Polystyrolträger.

Eine weitere Verwendung der erfundungsgemäßen Peptide besteht in immunogenen Mitteln. Diese enthalten mindestens ein Peptid, vorzugsweise ein oder mehrere Peptide der Nr. 1 bis 6, das die Produktion von Antikörpern, die fähig sind, Autoantigene bei Psoriasis zu erkennen, induziert.

Außerdem wird durch die Erfindung eine Testkit zur Bestimmung von α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörpern zum Nachweis von Psoriasis bereitgestellt.

Der Testkit umfaßt

- mindestens ein erfundungsgemäßes Peptid ggf. an eine feste Phase gebunden
- einen Puffer
- ein spezifisches Konjugat nebst Enzym
- eine Waschlösung
- die Substratlösung zum Nachweis der Enzymreaktion
- und eine Stopplösung

Der Bio-Assay umfaßt

- spontan pulsierende neonatale Kardiomyozyten in Primärkultur oder
- aus undifferenzierten embryonalen Stammzellen differenzierte Kardiomyozyten
- in einem Kulturmedium

Durch Entwicklung des neuen Testkits auf der Basis der erfindungsgemäßen Peptide lassen sich der Nachweis von Psoriasis und Verlaufsbeurteilungen einfach und schnell durchführen.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zum Nachweis von α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten. Die zu untersuchende Probe wird mit mindestens einem erfindungsgemäßen Peptid oder mit einer Verbindung dieser Peptide mit einem Trägermaterial unter solchen Bedingungen in Kontakt gebracht, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion zulassen. Der Nachweis wird anschließend mittels an sich bekannter chemischer oder physikalischer Methoden durchgeführt.

Die Anti- α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörper konnten in allen bisher untersuchten Seren von Patienten mit Psoriasis nachgewiesen werden und sind gegen die erste extrazelluläre Schleife des α 1-adrenergen Rezeptors gerichtet.

Da sich die Antikörper in in vitro Tests wie Hormone mit einer α 1-adrenergen Wirkung verhalten, kommt diesen Antikörpern eine Rolle in der Pathogenese zu. Weil sie in allen untersuchten Psoriasis-Seren nachweisbar sind, sind sie als diagnostische Marker von Bedeutung.

Als Bioassay wurden kultivierte neonatale Rattenherzzellen eingesetzt. In diesem Bioassay induzierten die aus dem Serum isolierten anti- α 1-Adrenozeptor Antikörper eine Beschleunigung der Pulsationsrate, die durch spezifische α 1-adrenerge Antagonisten beblockt werden konnte.

Der Nachweis dieser α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörper dient erfindungsgemäß sowohl der Früherkennung einer Psoriasis als auch als Grundlage für neuartige Therapieverfahren.

Gegenstand der Erfindung sind somit auch therapeutische Mittel gegen Psoriasis, die diese Peptide enthalten, da die Entfernung der α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörper aus dem Blut (zum Beispiel mittels spezifischer oder unspezifischer Immunadsorption) zu einer Besserung des klinischen Bildes führt oder zumindest eine Progredienz verhindern kann, was mit einer Verminderung der Beschwerden und insbesondere mit einer deutlichen Verbesserung der Lebensqualität der Patienten verbunden ist.

Die spezifische Immunadsorption wird durchgeführt an einer Säule, an der sich Peptide befinden, in denen mindestens die Antikörper-bindende Sequenz eines Peptides mit der Sequenz Nr. 1-7 enthalten ist.

Die unspezifische Immunadsorption wird durchgeführt an einer Säule, die bevorzugt Schafsbzw. Hühnerantikörper gegen die humanen Immunglobuline bzw. Protein A oder C1_q bzw. Immunglobulin bindende Peptide enthält. Weiterhin kann die unspezifische Immunadsorption mit Tryptophansäulen durchgeführt werden. Mit diesem Adsorber werden alle Ig des Blutplasmas so auch die gegen den α 1-adrenergen Rezeptor gerichteten Autoantikörper, gebunden und eliminiert unter Verwendung einer geeigneten und dem Fachmann bekannten Apparatur. Als Säulenmaterial für diese Adsorber wird bevorzugt Sepharose eingesetzt.

Legende zu Abbildung 1

Hemmung des positiv chronotropen Effektes der aus dem Serum von Psoriasis-Patienten isolierten anti- α 1-Adrenozeptor Autoantikörper durch das Peptid GRIFCD des α 1B-Rezeptors.

Patentansprüche

1. Peptide des α 1-adrenergen Rezeptors sowie ihre Mutanten und Varianten, die ein Epitop bilden und Autoantikörper binden können, die bei Psoriasis vorkommen.
2. Peptide nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß sie ganz oder teilweise oder als Variante der Sequenzen
Nr. 1 - LEVLGYWVLGRIFCD,
Nr. 2 - GRIFCD,
Nr. 3 - FWAFGRAFCDV,
Nr. 4 - GRAFCDV,
Nr. 5 - YWAFGRVFCNI,
Nr. 6 - GRVFCNI,
Nr. 7 - GRTFCDV aufgebaut sind.
3. Antikörper, die gegen das Epitop des α 1-adrenergen Rezeptors gerichtet sind, dadurch gekennzeichnet, daß sie die Peptide gemäß Anspruch 1 oder 2 erkennen.
4. Verwendung der ganzen humanen α 1-adrenergen Rezeptoren oder Teilen davon, mindestens enthaltend eine der Aminosäuresequenzen des Anspruchs 2 oder Teilen davon oder von funktionsanalogen Peptiden zur Bindung pathologischer, funktionell aktiver Autoantikörper, zu diagonalistischen und therapeutischen Zwecken bei Psoriasis.
5. Verwendung nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß rekombinant hergestellte Autoantikörperbindende Rezeptorteile der α 1-adrenergen Rezeptoren sowie funktionsanaloge Peptide verwendet werden.
6. Verwendung nach Anspruch 4 oder 5, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Aminosäuresequenz des Anspruchs 2 sowie funktionsanaloge Peptide oder Varianten davon enthaltende Moleküle löslich oder festphasengebunden zum direkten oder indirekten (kompetitiven) Antikörpernachweis in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut verwendet werden.
7. Verwendung nach Anspruch 4 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Aminosäuresequenz des Anspruchs 2 sowie funktionsanaloge Peptide oder Varianten davon enthaltende Moleküle festphasengebunden zur Bindung und Elimination der pathologischen, funktionell aktiven Autoantikörper in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, also zur Immunglobulinadsorption verwendet werden.

8. Verwendung nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die Aminosäuresequenzen in Kombination mit unspezifischen Gesamtimmunglobulin-bindenden Liganden verwendet werden.
9. Verwendung nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß zur Bindung und Elimination der pathologischen, funktionell aktiven Autoantikörper in Körperflüssigkeiten, insbesondere Blut, als unspezifische Gesamtimmunglobulin-bindende Liganden unspezifische Adsorbermoleküle wie Protein A, Protein G, anti-human-Immunglobuline sowie Gesamtimmunglobulinbindende Liganden wie Aminosäuren, insbesondere L-Tryptophan oder Peptide verwendet werden.
10. Verwendung von Peptiden, mindestens enthaltend mindestens eine Aminosäuresequenz des Anspruchs 2 sowie funktionsanaloge Peptide zur Immunisierung von Säugetieren zum Zwecke der Gewinnung poly- und monoklonaler Antikörper.
11. Verwendung von Antikörpern, die gegen mindestens eine Aminosäuresequenz des Anspruchs 2 und funktionsanaloge Peptide gerichtet sind, zur Immunisierung von Säugetieren zum Zwecke der Gewinnung antiidiotypischer Antikörper.
12. Antigenes Mittel zum Nachweis von Psoriasis, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1 bis 2, vorzugsweise der Nr. 1 bis 7 enthält.
13. Immunogenes Mittel, dadurch gekennzeichnet, daß es mindestens ein Peptid gemäß der Ansprüche 1 bis 2, vorzugsweise der Nr. 1 bis 7, enthält, das die Produktion von Antikörpern, die fähig sind, Autoantigene bei Psoriasis zu erkennen, induziert.
14. Testkit zur Bestimmung von α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörpern zum Nachweis von Präeklampsie oder maligner Hypertonie, enthaltend mindestens ein Peptid gemäß Anspruch 1 bis 2.
15. Verfahren zum Nachweis von Anti- α 1-adrenergen Rezeptor-Antikörpern in biologischen Flüssigkeiten, dadurch gekennzeichnet, daß man die zu untersuchende Probe mit mindestens einem Peptid der Ansprüche 1 bis 2 in Kontakt bringt oder einer Verbindung dieser Peptide mit einem Trägermaterial unter solchen Bedingungen, die eine Antigen-Antikörper-Reaktion zulassen und den Nachweis mittels an sich bekannter chemischer oder physikalischer Methoden führt.
16. Verwendung der Peptide gemäß Anspruch 1 bis 2 zur Herstellung therapeutischer Mittel gegen Psoriasis.

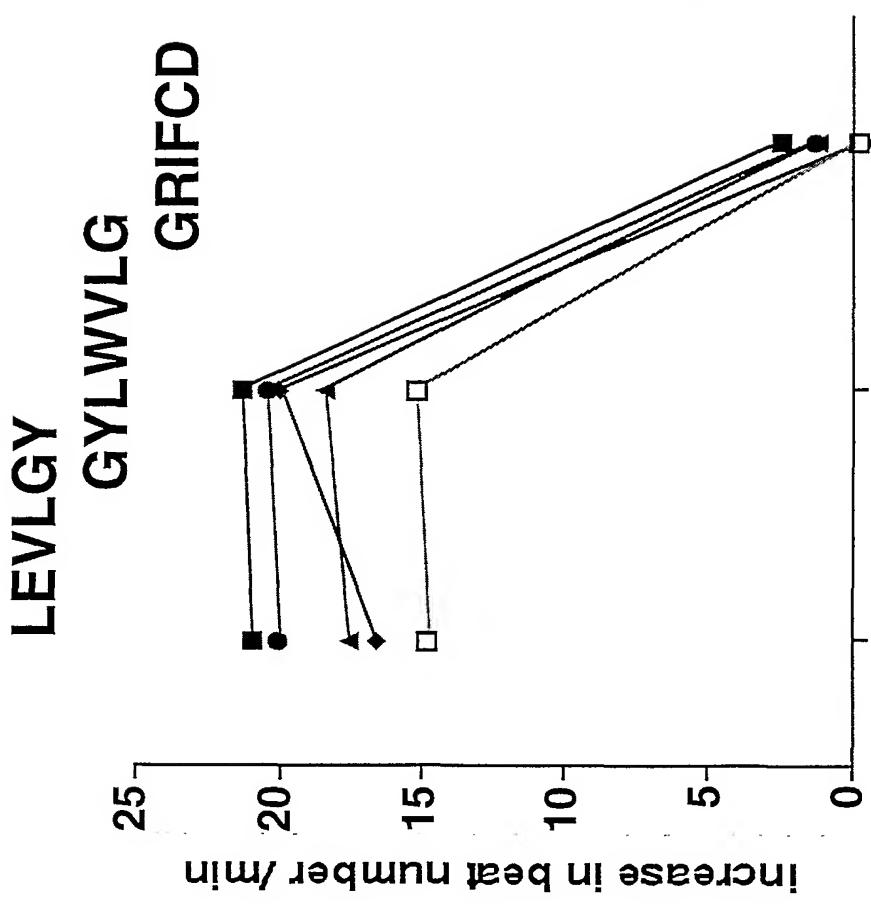


Abb. 1